

09/725,957

1638

lowe

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Januar 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/05976 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/31,
A01H 5/00, C12N 1/19, 1/21, C07K 14/395, C12N 15/82

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT00/00194

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Juli 2000 (12.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
A 1249/99 19. Juli 1999 (19.07.1999) AT

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): INNOVATIONSAGENTUR GESELLSCHAFT
M.B.H. [AT/AT]; Taborstrasse 10, A-1020 Wien (AT).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: ADAM, Gerhard [AT/AT]; Hasnerstrasse
96/14, A-1160 Wien (AT).

(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010
Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

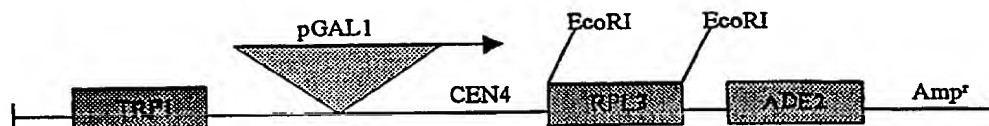
— Mit internationalem Recherchenbericht.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MUTATED RIBOSOMAL PROTEIN L3

(54) Bezeichnung: MUTIERTES RIBOSOMALES PROTEIN L3

Genotyp-Schema des Plasmids pZGA121
GENOTYPE DIAGRAM OF PLASMIDE pZGA121



(57) Abstract: The invention relates to a ribosomal protein L3 (RPL3), whereby the amino acid sequence thereof comprises a muta-
tion at the location of serine 2 and/or proline 9 and/or tryptophan 255 and/or histidine 256 so that the organism in which the mutated
RPL3 is expressed exhibits an increased trichothecene resistance. The invention also relates to a method for producing a mutated
DNA molecule which comprise a region that codes for RPL3 and which leads to an increased trichothecene resistance in the organism
in which it is expressed.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein ribosomales Protein L3 (RPL3), wobei dessen Aminosäuresequenz an der Stelle
Serin 2 und/oder Prolin 9 und/oder Tryptophan 255 und/oder Histidin 256 eine Mutation aufweist, so dass der Organismus, in dem das
mutierte RPL3 exprimiert wird, eine erhöhte Trichothecen-Resistenz aufweist, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines mutierten
DNA-Moleküls umfassend eine für RPL3 codierende Region, das in dem Organismus, in dem es exprimiert wird, zu einer erhöhten
Trichothecen-Resistenz führt.

WO 01/05976 A1

Mutiertes ribosomales Protein L3

Die vorliegende Erfindung betrifft ein ribosomales Protein L3 (RPL3), ein DNA-Molekül, das für dieses Protein codiert, einen biologisch funktionellen Vektor, umfassend das DNA-Molekül, ein Verfahren zur Herstellung von Trichothecen-toleranten rekombinanten Zellen, insbesondere Pflanzenzellen, und Pflanzen.

Weiters betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines DNA-Moleküls umfassend eine für RPL3 codierende Region, das in dem Organismus, in dem es exprimiert wird, zu einer erhöhten Trichothecen-Resistenz führt.

Trichothecene sind eine Gruppe von toxischen, sesquiterpenoiden, sekundären Metaboliten, welche hauptsächlich von pflanzenpathogenen Pilzen, wie Trichothecium, Fusarium, Myrothetium, Trichoderma, Stachybotrys gebildet werden. Insgesamt sind mehr als 180 verschiedene natürlich vorkommende Verbindungen verschiedener Gruppen isoliert worden. Meistens werden folgende vier Toxin-Gruppen beschrieben, die sich in ihrem chemischen Aufbau unterscheiden: Die größte Bedeutung haben die Gruppe A und B, die sich durch das Vorkommen einer Ketogruppe am C₈ unterscheiden. Toxine der Gruppe C besitzen an der gleichen Stelle (zwischen C₈ und C₇) eine weitere Epoxygruppe. Die makrozyklischen Trichothecene werden in Gruppe D zusammengefasst.

Trichothecene spielen als Virulenzfaktor bei der Pflanzenpathogenese von Pilzen eine große Rolle. Die toxische Wirkung der Trichothecene, die je nach Struktur der Trichothecene unterschiedlich hoch ist, beruht im Wesentlichen auf durch Bindung an ribosomale Untereinheiten verursachte Inhibierung der Translation (Cundliffe et al., Inhibition of initiation, elongation and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins; Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1977), Vol. 11, Nr. 3, S. 491-499).

Das in Getreide wichtigste Mykotoxin ist Deoxynivalenol (DON), ein Vertreter der Typ B-Trichothecene, wobei der TDI-Wert

(tolerable daily intake) für Erwachsene und Kinder auf 3 µg DON/kg Körpergewicht bzw. 1,5 µg/kg geschätzt wird.

Die Kontamination wichtiger landwirtschaftlicher Produkte, wie Weizen, Gerste oder Mais mit Mykotoxinen, wie den Trichothecenen, ist ein weltweites Problem. Ihre Verbreitung in diesen landwirtschaftlichen Produkten hat nicht nur beim unmittelbaren Verzehr dieser Lebensmittel durch den Menschen, sondern auch bei der Verfütterung an Nutztiere in der Landwirtschaft, negative Auswirkungen auf deren Gesundheit.

Trichothecen-Intoxikationen sind mit Brechreiz, Diarrhoe, Anorexie, Ataxie, Leukocystose und nachfolgend schwerer Leukopenie, Entzündungen des Magen-Darm-Traktes, Zerstörung von Nervenzellen des Zentralnervensystems, Hämorrhagie des Herzmuskels, Läsionen von Lymphknoten, Testes und Thymus und Gewebsnekrosen verbunden.

Auch die chronische Aufnahme von geringen Mengen von Trichothecenen ist problematisch, da Effekte wie Beeinträchtigung des Immunsystems und Störungen des Neurotransmitterhaushaltes auftreten können (B. Rotter, D. Prelusky und J. Pestka, Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin), J. Toxicol. Environ. Health 48 (1996), 1-34).

Die aussichtsreichste und einzige nachhaltige Lösung des Problems der Trichothecen-Kontamination von Lebensmitteln ist die Züchtung von Pflanzen, die erhöhte Resistenz gegen Fusarium-Arten aufweisen und auch nach Befall nur niedrige Mykotoxin-Konzentrationen aufweisen. Es sind im verfügbaren Zuchtmaterial von Weizen, Gerste, etc. jedoch keine vollständigen Resistenzen bekannt, sondern nur polygen vererbte, quantitative Unterschiede. Dabei ist eine Erfahrung der Pflanzenzüchter, dass eine hohe Resistenz gegen DON in vitro stark mit hoher Feldresistenz gegen Fusarium (geringe visuell bonitierte Symptome) und niedrigem DON-Gehalt im Erntegut nach artifizieller Inokulation korreliert ist.

Es ist anzunehmen, dass DON als Protein Biosynthese-Inhibitor die aktive Abwehr der Pflanze unterdrückt und andererseits in

Toxin-resistenteren Pflanzen die natürliche Abwehr gegen den Pilz effizienter ist.

Mit Hilfe einer semidominanten Mutante der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* Stamm CLP1, die resistent gegen Trichodermin, einem Vertreter der Trichothecene war, konnten Fried und Warner (Cloning of yeast gene for trichodermin resistance and ribosomal protein L3, Proc. Natl. Acad. Sci., USA; Vol. 78, Nr. 1, S. 238-242, Jänner 1981) zeigen, dass das ribosomale Protein L3 (RPL3) der Wirkungsort dieses Toxins ist, siehe auch L.D. Schultz und J.D. Friesen (1983): Nucleotide sequence of the *tcm1* gene (ribosomal protein L3) of *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol 155, 8-14.

In der Schrift von Ohtake et al. ("Yeast Virus Propagation depends critically on free 60S ribosomal subunit concentration"; Molecular and Cellular Biology, May 1995, (2772-2781)) wird beschrieben, dass Mutationen in verschiedenen MAK-Genen (z.B. im RPL3-Gen) zu einer Verringerung der freien 60S Ribosomen-Untereinheiten führen und sich auf die Bildung des Toxin-codierenden Satelliten M_1 des L-A doppelsträngigen RNA-Virus auswirken.

Gemäß der Veröffentlichung von Peltz et al. ("Ribosomal Protein L3 mutants alter translational fidelity and promote rapid loss of the yeast killer virus", Molecular and Cellular Biology, Jan. 1999 (384-391)) führen Mutationen im RPL3-Gen zu einer Verringerung der Translation des M_1 Killer-Virus.

In der Schrift von Liebich et al. ("Two genes encoding ribosomal protein L3 of *Schizosaccharomyces pombe* and their proximal promoter regions", Gene 142 (1994), (119-122)) wird die geklonte Sequenz von zwei Genen (RPL3-1 und RPL3-2) beschrieben. Diese Sequenzen weisen ein Sequenzfragment auf, das 75% Identität zu einem Sequenzfragment des *Saccharomyces cerevisiae* RPL3-Gens zeigt.

Die Schrift von Steel et al. ("Sequence and developmental regulation of the gene that encodes the *Dictyostelium discoideum* L3 ribosomal protein", Gene 162 (1995), (123-128)) betrifft genomische und rekombinante Plasmide, die für das RPL3-Protein von

Dictyostelium discoideum (Dd) codieren. Die Sequenzen dieser Plasmide weisen einen hohen Grad an Homologie zu Genen von RPL3-Proteinen von niederen und hohen Eukaryoten auf.

Das Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, aufgrund von molekular-biologischen Untersuchungen die Ursache der Resistenz festzustellen und aufgrund dieser Feststellung weitere zur Resistenz führende Mutationen des ribosomalen Proteins L3 zur Verfügung zu stellen, so dass Trichothecen-resistente Zellen, insbesondere Pflanzenzellen, sowie Trichothecen-resistente Pflanzen erhalten werden können. Es sollen weiters DNA-Moleküle, codierend für das mutierte Protein, zur Verfügung gestellt werden.

Das erfindungsgemäße RPL3 der eingangs angeführten Art ist dadurch gekennzeichnet, dass dessen Aminosäuresequenz an der Stelle Serin 2 eine Mutation aufweist, so dass der Organismus, in welchem das mutierte RPL3 exprimiert wird, eine erhöhte Trichothecen-Resistenz aufweist.

Diese Mutationsstelle in der Aminosäuresequenz zur Herstellung von Trichothecen-resistenten Organismen kann beispielsweise durch Mutation eines gut etablierten Labororganismus, wie von *Saccharomyces cerevisiae*, anschließender Selektion in Trichothecen-hältigem Nährboden und Sequenzieren der resistenten Stämme gefunden. Dabei ist jede Mutation an der Serin 2-Stelle denkbar, solange das RPL3 weiterhin funktionsfähig bleibt. Eine Mutation an der Serin 2-Stelle der Aminosäuresequenz kann bei RPL3-Proteinen eines jeden Organismus durchgeführt werden, z.B. bei Säugern, Pflanzen, Pilzen sowie Mikroorganismen. Dabei sind diese Begriffe im weitesten Sinn zu verstehen, so dass alle Organismen bzw. Zellen davon betroffen sind, die ein RPL3 aufweisen.

Unter Trichothecen-Resistenz wird eine Resistenz gegen einen, mehrere oder alle Trichothecen-Typen verstanden, insbesondere gegen Typ B und DON, wobei Zellen, die das mutierte RPL3-Gen enthalten, bei bestimmten für Wildtypen inhibitorischen Trichothecen-Konzentrationen noch wachsen können. Diese mutierten Zellen weisen vorzugsweise eine 50 % höhere Resistenz, besonders bevorzugt eine 200 % höhere Resistenz, gegen Trichothecene, verglichen mit den jeweiligen Wildtypen, auf.

Ein vorteilhaftes RPL3 weist an der Stelle Serin 2 eine Aminosäure mit einer aliphatischen Seitenkette auf.

Vorzugsweise umfasst das RPL3 eine Aminosäuresequenz, die an Stelle des Serins 2 ein Prolin aufweist. Wurde das Serin gegen ein Prolin ausgetauscht, weisen die Zellen mit diesem rekombinanten RPL3 eine besonders hohe Resistenz gegenüber Trichothecen auf.

Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung betrifft ein RPL3, dessen Aminosäuresequenz an der Stelle Prolin 9 eine Mutation aufweist, so dass der Organismus, in dem das mutierte RPL3 exprimiert wird, eine erhöhte Trichothecen-Resistenz aufweist. Auch hier kann Prolin durch jegliche Aminosäure ausgetauscht werden, solange das Protein aktiv bleibt. Besonders bevorzugt ist ein RPL3, dessen Aminosäuresequenz an Stelle des Prolins eine andere Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette aufweist. Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn die Aminosäuresequenz an Stelle des Prolins ein Leucin aufweist. Durch diese Mutation wird ein rekombinanter Organismus erhalten, der resistent gegenüber Trichothecenen ist.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein RPL3, ausgenommen RPL3 aus *Saccharomyces cerevisiae* Stamm CLP1, dessen Aminosäuresequenz an der Stelle des Tryptophans 255 eine Mutation aufweist, so dass der Organismus, in dem das mutierte RPL3 exprimiert wird, eine erhöhte Trichothecen-Resistenz aufweist. Durch eine Mutation an dieser Stelle, wobei das Tryptophan durch jegliche andere Aminosäure ausgetauscht werden kann, werden Organismen zur Verfügung gestellt, die eine gegenüber Trichothecenen höhere Resistenz um über 50 %, insbesondere über 200 %, verglichen mit dem Wildtyp aufweisen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung erfolgt die Nummerierung der Aminosäuresequenz entsprechend der Nummerierung der Aminosäuren der Seq.ID.Nr.1 (aus *Saccharomyces cerevisiae*). Manche Organismen weisen eine durch Insertion bzw. Deletion einiger Aminosäuren verschobene Sequenz auf. Bei diesen Sequenzen bezieht sich die jeweilige ausgetauschte Aminosäure auf die ent-

sprechende gleiche Aminosäure, die sich jedoch um eine oder mehrere Aminosäuren weiter oben oder unten in der Sequenz befindet.

Bei manchen Organismen befindet sich das entsprechende Tryptophan an der Stelle 252 (s. Adams et al., "Sequence identification of 2, 375 human brain genes", Nature 355 (6361), 632-634 (1992)), bzw. an der Stelle 257 (s. die Sequenz von *Drosophila melanogaster*, Hinterlegungsnummer 016797, von Chan et al.), oder auch 258 (s. Nishi et al., "The primary structure of two proteins form the large ribosomal subunit of rice"; Biochim. Biophys. Acta 1216 (1), 110-112 (1993)), um nur einige Beispiele zu nennen. Selbstverständlich wird gemäß der vorliegenden Erfindung jeweils das dem Tryptophan 255 der Seq.ID.Nr. 1 entsprechende Tryptophan ersetzt.

Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn die Aminosäuresequenz an Stelle des Tryptophans ein Cystein oder Methionin aufweist. Durch den Ersatz des Tryptophans mit einer Aminosäure mit schwefelhaltiger Seitenkette werden besonders resistente Zellen erhalten. Besonders günstig ist es, wenn die Aminosäuresequenz anstelle des Tryptophans ein Cystein aufweist. Dies stellt einen für Trichothecen-resistente Zellen besonders optimalen Austausch dar.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein RPL3, dessen Aminosäuresequenz an der Stelle des Tryptophans 255 eine Aminosäure mit basischer Seitenkette aufweist, so dass der Organismus, in dem das mutierte RPL3 exprimiert wird, eine erhöhte Trichothecen-Resistenz aufweist. Wird das Tryptophan 255 durch eine Aminosäure mit basischer Seitenkette ersetzt, werden ebenfalls besonders resistente Zellen erzeugt, die gleichzeitig eine ausreichende Lebensfähigkeit aufweisen. Auch hier gilt wiederum, dass bei verschobener Aminosäuresequenz das jeweilige entsprechende Tryptophan ausgetauscht wird.

Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn die Aminosäuresequenz an Stelle des Tryptophans ein Arginin aufweist. Das Arginin wirkt an dieser Stelle besonders resistenzfördernd.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein RPL3, dessen Aminosäuresequenz an der Stelle des Histidins 256 eine Mutation aufweist, so dass der jeweilige Organismus, in dem das mutierte RPL3 exprimiert wird, eine erhöhte Trichothecen-Resistenz aufweist. Dabei kann das Histidin 256 durch jede mögliche Aminosäure ersetzt werden, solange die Funktion des RPL3 gewährleistet ist. Auch hier gilt wiederum, dass bei verschobener Sequenz das jeweils entsprechende Histidin ausgetauscht wird.

Vorzugsweise weist die Aminosäuresequenz an Stelle des Histidins eine Aminosäure mit einer aromatischen Seitenkette auf. Eine Aminosäure mit aromatischer Seitenkette wirkt an dieser Stelle besonders resistenzfördernd, wobei es besonders günstig ist, wenn die Aminosäuresequenz an Stelle des Histidins ein Tyrosin aufweist. Durch den Ersatz von Histidin durch Tyrosin bleibt die Aktivität des RPL3 erhalten, wobei eine hohe Trichothecen-Resistenz erhalten wird.

Für eine hohe Resistenz ist es weiters günstig, wenn die Aminosäuresequenz des RPL3 an zwei Stellen eine Mutation wie oben beschrieben aufweist. Dabei kann jede erdenkliche Kombination möglich sein, z.B. eine Mutation an der Stelle Serin 2 und eine weitere Mutation an der Stelle Prolin 9 bzw. zusätzlich eine Mutation an der Stelle des Tryptophans 255 und/oder eine Mutation an der Stelle des Histidins 256. Mutanten mit zumindest zwei der oben beschriebenen Mutationen können noch bessere Resistenzeigenschaften aufweisen als die Einzelmutanten, da sie um zumindest eine Konzentrationsstufe resistenter sein können.

Eine optimale Resistenz eines Organismus wird dadurch erhalten, dass die Aminosäuresequenz des RPL3 eine Mutation im C-terminalen Bereich und eine im N-terminalen Bereich aufweist. Auch hier sind wieder verschiedene Kombinationen möglich, so z.B. eine Mutation an der Stelle Serin 2 in Kombination mit einer Mutation an der Stelle Tryptophan 255 bzw. eine Mutation an der Stelle Prolin 9 in Kombination mit einer Mutation an der Stelle Histidin 256 oder umgekehrt. Die Doppelmutante P9L/W255R zeigt eine erhöhte Trichothecen-Resistenz, die Doppelmutante mit dem Allel S2P/W255R weist besonders hohe Resistenzeigenschaften auf.

Bei all diesen oben beschriebenen Mutationen handelt es sich dabei um für die Trichothecen-Resistenz entscheidende Mutationen. Es ist selbstverständlich, dass jegliche weitere Mutationen im Rahmen dieser Erfindung vorgesehen sein können, solange sie die Aktivität des RPL3 nicht wesentlich vermindern, d.h. die Lebensfähigkeit des mutierten Organismus nicht gefährdet wird. Es können dabei z.B. andere Substitutions-, Deletions- und/oder Insertionsmutationen vorgesehen sein, die für den Fachmann auf diesem Gebiet ohne weiteres erhältlich sind und auf ihre Lebensfähigkeit und Resistenzeigenschaften vor allem mit den hierin dargestellten Methoden überprüft werden können.

Weiters kann es besonders günstig sein, wenn am C-Terminus der Aminosäuresequenz eine zusätzliche Sequenz angehängt ist. Diese zusätzliche Sequenz kann z.B. mittels PCR eingeführt werden, wobei die Sequenz für verschiedene Funktionen eingesetzt werden kann, z.B. als Epitop für Antigen-Antikörperreaktionen bzw. eine Sequenz, die zum Nachweis des Proteins dient.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein DNA-Molekül, das für eines der oben beschriebenen RPL3-Proteine codiert. Neben den Mutationen, die zum Austausch der oben genannten Aminosäuren führen, kann es auch jegliche andere Mutationen beinhalten, solange es für ein aktives, funktionsfähiges RPL3 mit Trichothecen-Resistenz codiert.

Von Vorteil ist weiters ein DNA-Molekül, das eine Teilsequenz des oben beschriebenen DNA-Moleküls, inklusive des jeweils mutierten Bereiches, umfasst. Dieses kann z.B. eine Sequenz im C-Bereich als auch eine Sequenz im N-Bereich des RPL3 umfassen, wichtig ist lediglich, dass es zumindest eine der oben beschriebenen Mutationen, die zur Trichothecen-Resistenz führen, umfasst und zumindest eine Länge von 15-25 bp, insbesondere von über 25 bp, aufweist. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung sind hierunter auch die jeweiligen Komplementärsequenzen zu verstehen. Es können z.B. zwei Teilsequenzen zur Verfügung gestellt werden, die als Primer für eine PCR-Reaktion verwendet werden. Dadurch können die spezifischen mutierten Sequenzen amplifiziert und so z.B. nachgewiesen werden.

Besonders bevorzugt ist ein DNA-Molekül, das kovalent mit einer nachweisbaren Markierungssubstanz assoziiert ist. Diese molekularen Marker sind insbesondere nützlich zum Auffinden von in genetischen Ressourcen natürlicherweise vorhandenen oder durch klassische Mutationsverfahren induzierte Varianten eines RPL3-Gens einer (Nutz)pflanze, die einer der in Hefe identifizierten resistenzvermittelnden Mutationen entsprechen und zu erhöhter Trichothecen-Resistenz führen. Das DNA-Molekül bindet an die homologe Sequenz und die Markierungssubstanz wird in der Folge nachgewiesen. Diese Markierungssubstanz kann beispielsweise eine fluoreszierende, lumineszierende, radioaktive Substanz sowie eine nichtisotrope Markierung sein. Dadurch werden Reagentien bereitgestellt, die für den Nachweis, die Selektion und Quantifizierung von homologen Sequenzen in Flüssigkeitsproben aber auch in festen Gewebeproben, z.B. von Pflanzen, durch Hybridisierungsverfahren oder PCR-Verfahren nützlich sind.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen biologisch funktionellen Vektor, der ein oben beschriebenes DNA-Molekül umfasst. Zur Transformation in Wirtszellen ist ein eigenständiger vermehrungsfähiger Vektor notwendig, wobei je nach Wirtszelle, Transformationsmechanismus, Aufgabe und Größe des DNA-Moleküls ein passender Vektor verwendet werden kann. Diese Vektoren sind jedem Fachmann bestens bekannt, so dass auf eine Aufzählung aller möglichen Vektorenarten in dieser Anmeldung verzichtet wird.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Trichothecen-toleranten rekombinanten Zellen, wobei zumindest ein erfindungsgemäßes DNA-Molekül oder ein Vektor wie oben beschrieben in die Zelle eingeschleust und das mutierte RPL3 exprimiert wird.

Wird das erfindungsgemäße DNA-Molekül oder der Vektor in eine Zelle effizient eingeschleust, exprimiert die Zelle rekombinantes RPL3 und weist somit eine erhöhte Trichothecen-Resistenz auf. Das Einschleusen des DNA-Moleküls oder des Vektors in die Zelle kann auf unterschiedliche Arten bewerkstelligt werden, beispielsweise durch Agrobacterium-vermittelte Transformation, mittels des biolistischen Verfahrens (particle gun), durch Elek-

troporation, oder verschiedene Methoden des direkten DNA-Transfers in Protoplasten. Auch diese Methoden sind jedem Fachmann bestens bekannt, so dass auf eine detaillierte Erläuterung dieser Methoden hier verzichtet werden kann. Die Selektion einer erfolgreichen Einschleusung des DNA-Moleküls in eine Zelle kann direkt mit Trichothecen-hältigem Nährboden durchgeführt werden (Selektions-Marker). Dabei können Medien verwendet werden, die unterschiedlichste Verbindungen der Trichothecen-Klasse im jeweiligen sinnvollen Konzentrationsbereich enthalten.

Eine weitere Selektion kann z.B. durch Selektion auf einen konventionellen Transformationsmarker (z.B. Antibiotika- oder Herbizidresistenz und anschließendes Screening auf Trichothecen-Resistenz) erfolgen oder auch dadurch, dass das in die Zelle integrierte DNA-Molekül für ein weiteres Protein codiert, das sichtbar ist oder gemacht werden kann. Somit ist eine erfolgreiche transformierte Zelle sichtbar (Screening-Marker). Solche Proteine sind z.B. die β -Glucuronidase, Luciferase oder Grünfluoreszenz-Protein aus Quallen.

Weiters wird ein Verfahren zur Herstellung von Trichothecen-toleranten rekombinanten Pflanzen bzw. Pflanzenzellen zur Verfügung gestellt, wobei zumindest ein erfindungsgemäßes DNA-Molekül oder ein oben beschriebener Vektor in die Pflanze bzw. Pflanzenzellen eingeschleust und das mutierte RPL3 exprimiert wird.

Es ist jede Pflanzen-Transformations-Technologie, von der bereits eine Reihe beschrieben und erfolgreich eingesetzt wurden, möglich. Eine Möglichkeit sind direkte DNA-Transfers, so z.B. mittels chemischer Behandlung, Elektroporation und insbesondere Partikel-Bombardement (Methode, bei der schwere Metallpartikel, die DNA-Material tragen, mit hoher Beschleunigung direkt auf Pflanzengewebe geschossen werden). Weiters ist es möglich, die DNA in Samen unter Vakuum einzuschleusen oder mittels mikroskopischer Nadeln oder Fasern die Penetration von DNA in spezifische Pflanzengewebe, möglicherweise zum Teil verdautes Pflanzengewebe, zu erleichtern. Auch virale Vektoren können zum Einschleusen des erfindungsgemäßen mutierten RPL3 in Pflanzen bzw. -zellen eingesetzt werden.

Zur Transformation der Pflanze kommt z.B. das Ti-Plasmid mit dem Agrobacteriumsystem in Frage. Agrobakterien verursachen bei Pflanzen Wurzelhals-Gallen. Wenn Agrobakterien eine verletzte Pflanze infizieren, gelangen die Bakterien selbst nicht in die Pflanze sondern sie schleusen den rekombinanten DNA-Abschnitt, die sogenannte T-DNA aus dem ringförmigen extrachromosomalen Tumorminduzierenden Ti-Plasmid in die Pflanzenzellen ein. Die T-DNA und damit auch das darin eingefügte DNA-Molekül wird stabil in die chromosomale DNA der Zelle eingebaut, so dass die Gene der T-DNA in der Pflanze exprimiert werden. Pflanzen weisen eine besondere Eigenschaft auf; sie sind nämlich in der Lage, sich aus einer (transformierten) Zelle bzw. aus einem Protoplasten zu einer vollständigen Pflanze wieder zu entwickeln, die gezüchtet werden kann.

Verschiedene Pflanzengewebe können transformiert werden, so z.B. ein ungereiftes Embryo, ein Kallus aus Samen, ein Meristem, etc.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff "Pflanze" jede Pflanzenart verstanden, insbesondere solche, die in der Landwirtschaft eine Rolle spielen, z.B. Mais, Weizen, Gerste, Reis, Sojabohnen, Bohnen, Baumwolle, Tomaten, Tabak.

Wird ein Vektor umfassend eine DNA, die ein oben beschriebenes mutiertes, rekombinantes RPL3 codiert, in eine Pflanze bzw. Pflanzenzelle transformiert, so wird dadurch eine Pflanze mit erhöhter Trichothecen-Resistenz hergestellt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Zellen, die im Genom ein oben beschriebenes DNA-Molekül bzw. eine oben beschriebene Mutation umfassen, so dass sie ein erfindungsgemäß mutiertes RPL3 exprimieren und dadurch eine Trichothecen-Toleranz aufweisen. Das Ausmaß der Trichothecen-Toleranz hängt dabei von der jeweiligen Mutation im DNA-Molekül ab. Durch bestimmte Mutationen im RPL3-Gen können weiters Zellen zur Verfügung gestellt werden, die eine Trichothecen-Hypersensitivität aufweisen. Durch das Vorsehen verschiedener Zellkulturen mit unterschiedlichen Hypersensitivitäts- bzw. Toleranzeigenschaften können z.B. die Art und Menge der Trichothecen-Kontamination in Stoffen nachgewiesen werden.

Vorzugsweise weisen die Zellen eine Typ B-Trichothecen-Toleranz und besonders bevorzugt eine Deoxynivalenol (DON)-Toleranz auf. Diese Zellen können insbesondere in der Landwirtschaft bzw. bei der Qualitätskontrolle bei der Herstellung von Landwirtschaftsprodukten eingesetzt werden.

Dabei ist es besonders günstig, wenn die Zellen eine erhöhte Trichothecen-Resistenz von über 50 %, vorzugsweise über 200 %, verglichen mit dem jeweiligen Wildtyp aufweisen. Dies gewährleistet eine Toxin-Kontrolle auch bei höheren Toxin-Konzentrationen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Pflanze bzw. Pflanzenzellen, die im Genom ein oben beschriebenes DNA-Molekül bzw. eine derartige Mutation umfasst bzw. umfassen, so dass sie ein erfindungsgemäß mutiertes RPL3 exprimiert bzw. exprimieren und dadurch eine Trichothecen-Toleranz aufweist bzw. aufweisen. Diese Toxin-resistenten Pflanzen sind in der natürlichen Abwehr gegen den Pilz effizient. Auf diese Weise werden Pflanzen gezüchtet, die weniger anfällig auf Pilzkontaminationen sind, so dass dadurch die Ertragseinbußen, z.B. bei Getreide, und die Wertminderung des Erntegutes stark verringert werden.

Vorzugsweise weist bzw. weisen die Pflanze bzw. die Pflanzenzellen eine Typ B-Trichothecen-Toleranz, besonders bevorzugt eine DON-Toleranz auf. Die Typ B-Trichothecene sind wie oben bereits beschrieben, besonders für die Kontamination landwirtschaftlicher Produkte verantwortlich, wobei DON ein Vertreter der Typ B-Trichothecene von besonderer Wichtigkeit ist. Durch das Zurverfügungstellen von Trichothecen-toleranten Pflanzenzellen können Trichothecen-tolerante Pflanzen herangezüchtet werden, wobei die Typ B-Trichothecen-toleranten Pflanzen und insbesondere die DON-toleranten Pflanzen für die Landwirtschaft von Bedeutung sind.

Dabei ist es von besonderem Vorteil, wenn die Pflanze bzw. die Pflanzenzellen eine erhöhte Trichothecen-Resistenz von über 50 %, vorzugsweise über 200 %, verglichen mit dem jeweiligen Wildtyp aufweist bzw. aufweisen. Hierbei hängt wiederum die Toleranzeigenschaft der Pflanze bzw. der Pflanzenzellen von der Art

der Mutation ab, wobei manche Mutationen eine geringere Toleranz herbeiführen und andere wiederum eine höhere Toleranz. Auch ist der Toleranztyp von der Mutation abhängig. Dabei kann je nach Einsatz der Pflanze bzw. Pflanzenzellen jeweils eine bestimmte Mutation besonders bevorzugt sein.

Das Verfahren zur Herstellung eines DNA-Moleküls der eingangs angeführten Art ist dadurch gekennzeichnet, dass ein Wildtyp-RPL3-Gen punktmutiert wird, wonach das mutierte Gen in einen Testorganismus eingeschleust wird, das daraufhin mutiertes RPL3 exprimiert, wobei der Testorganismus anschließend auf einem Nährmedium umfassend Trichothecen kultiviert und selektiert wird, wonach mutierte DNA-Moleküle aus den selektierten Klonen isoliert und gereinigt und gegebenenfalls sequenziert werden.

Das Wildtyp-RPL3-Gen wird mutiert, entweder durch Zufallsmutationsmethoden oder auch zielgerichtete Mutation, wobei einzelne Basen ausgetauscht werden. Es kann dabei eine einzige Base ausgetauscht werden, möglich sind aber auch zwei bis drei oder mehr Basen. Wichtig ist dabei lediglich, dass zumindest eine, verglichen zum Wildtyp-Gen andere Aminosäure durch den Basenaustausch entsteht. Das Gen wird mit Hilfe von den oben bereits beschriebenen Methoden, die dem Fachmann bekannt sind, in einen Testorganismus eingeschleust, wobei der Testorganismus z.B. Hefe oder Bakterien sein kann. Der Testorganismus, der das mutierte RPL3 exprimiert, wird auf einem Nährmedium umfassend Trichothecen irgendeines Typs und in verschiedenen Konzentrationen kultiviert. Lediglich die Testorganismen, die das mutierte RPL3-Gen erfolgreich aufgenommen und ein funktionelles RPL3 exprimieren, können auf dem Nährmedium umfassend Trichothecen wachsen, wenn die in das RPL3-Gen eingefügte Mutation zu einer Trichothecen-Toleranz führt. Je nach Mutation werden Testorganismen erhalten, die mehr oder weniger gut in diesem Nährmedium umfassend Trichothecen wachsen können. Einzelne Klone der Trichothecen-toleranten Testorganismen werden ausgewählt, können gegebenenfalls einzeln vermehrt werden, so dass eine ausreichende Menge an DNA isoliert und gereinigt werden kann. Anschließend kann zur Überprüfung der Mutation das jeweilige DNA-Molekül sequenziert werden, wobei jede bekannte Sequenziermethode angewandt werden kann.

- 14 -

Dabei ist es besonders von Vorteil, wenn der Testorganismus, in den das mutierte DNA-Molekül eingeschleust ist, eine Hypersensitivität gegenüber Trichothecene aufweist. Die Hypersensitivität des Testorganismus kann z.B. durch Beeinträchtigung von Detoxifikationsenzymen, etwa durch Deletion des entsprechenden Gens, gewährleistet werden. Dadurch wird ermöglicht, dass die Selektion des Testorganismus auf einem Nährmedium mit einer geringeren Konzentration an Trichothecen durchgeführt werden kann. Dies verringert den Verbrauch an Trichothecen, was kostengünstiger ist, und auch bessere Arbeitsbedingungen im Labor sind dadurch gewährleistet.

Vorzugsweise weist der Testorganismus, in den das mutierte DNA-Molekül eingeschleust ist, eine Disruption im genomischen RPL3 auf. Dies ist eine einfache und effiziente Methode, einen gegenüber Trichothecen hypersensitiven Testorganismus zu erhalten, ohne jegliche andere Eigenschaften des Testorganismus zu beeinflussen.

Dabei ist es weiters günstig, wenn das mutierte DNA-Molekül zumindest einen Selektions-Marker aufweist. Dies kann z.B. eine Antibiotika-Resistenz im Testorganismus einführen, so dass zusätzlich zum Trichothecen das Nährmedium das bestimmte Antibiotika umfasst. Eine andere Möglichkeit stellt z.B. ein DNA-Molekül dar, das für ein Protein codiert, das in einem bestimmten Nährmedium zur Färbung bzw. Entfärbung des Klons führt, s. z.B. den ADE2-Marker. Durch diese zusätzliche Selektion von erfolgreich eingeschleuster DNA wird eine eindeutige Erkennung dieser Klone sichergestellt.

Ein besonders vorteilhaftes Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass die Mutation mittels Hydroxylamin durchgeführt wird (s. L. Fishbein, W.G. Flamm und H.L. Falk (1970): Chemical Mutagens, Academic Press, NY; R.S. Sikorski und J.D. Boeke (1991): In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast, Methods in Enzymology 194, 302-318). Das Hydroxylamin wird in einer bestimmten Konzentration zugesetzt, was zu Zufallsmutationen in DNA-Molekülen führt. Dadurch werden DNA-Moleküle erhalten, die Mutationen an den verschiedensten Stellen aufweisen. Je mehr DNA-Moleküle mit unterschiedlichen

Mutationen erhalten werden, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass Mutationen, die zur Trichothecen-Toleranz führen, wenn das mutierte RPL3-Gen im Organismus exprimiert wird, erhalten werden.

Eine weitere günstige Möglichkeit besteht darin, dass die Mutation in einem E. coli-Mutationsstamm, z.B. XLI-Red, durchgeführt wird (s. A. Greener, M. Callahan und B. Jerpseth: An efficient random mutagenesis technique using an E. coli mutator strain. In: Methods in Molecular Biology, Bd. 57 (In vitro Mutagenesis Protocols, Hrsg. M.K. Trower), S. 375-385, Humana Press, Totowa, NJ). Dieser E. coli-Stamm weist eine ausgesprochen hohe Spontan-Mutationsrate für DNA-Moleküle, die in diesen Stamm eingeschleust werden auf. Auch diese Mutationen beruhen auf dem Zufallsprinzip, so dass eine Reihe von DNA-Molekülen mit verschiedensten Mutationen gewonnen werden.

Besonders bevorzugt umfasst das Nährmedium zur Selektion der transformierten Wirtsorganismen zumindest 100 ppm DON, vorzugsweise zumindest 200 ppm DON. Insbesondere bei Konzentrationen von 200 ppm DON können erfolgreich transformierte Testorganismen selektiert werden, da die Konzentration ausreichend ist, um nicht-transformierte Testorganismen an einem Wachstum in diesem Nährmedium zu hindern, und andererseits nicht zu hoch ist, so dass erfolgreich transformierte Testorganismen mit den gewünschten Mutationen im DNA-Molekül wachsen können.

Vorzugsweise werden nach Isolierung und Reinigung der mutierten DNA-Moleküle diese in Wirtszellen eingeschleust, die auf Nährmedium umfassend Trichothecen kultiviert und selektiert werden, wonach mutierte DNA-Moleküle gegebenenfalls wiederum isoliert und gereinigt werden. Diese Wirtszellen können andere sein als die oben genannten Testorganismen, mit dem Ziel, bestimmte Trichothecen-tolerante Zellen herzustellen, die dann zu weiteren Zwecken dienen können. Zur Sicherstellung, dass diese eingeschleusten DNA-Moleküle dieselbe Trichothecen-Toleranz-Mutation aufweisen, können aus diesen Wirtszellen DNA-Moleküle wiederum isoliert und gereinigt und in der Folge sequenziert werden. Selbstverständlich können diese Wirtszellen wiederum dieselben

Zellen wie die obengenannten Testorganismen sein, etwa um weitere Versuche durchzuführen.

Gemäß einem besonders vorteilhaften Verfahren wird das Wildtyp-RPL3-Gen an der Stelle Serin 2 und/oder Prolin 9 und/oder Histidin 256 punktmutiert. Auf diese Weise werden DNA-Moleküle erhalten, die in dem Organismus, in dem es exprimiert wird, zu einer besonders hohen Trichothecen-Resistenz führen.

Besonders bevorzugt werden nach Isolierung und Reinigung der mutierten DNA-Moleküle diese in Pflanzen bzw. Pflanzenzellen transformiert. Dies können z.B. die aus dem oben genannten Testorganismus isolierten DNA-Moleküle sein, vorzugsweise sind es jedoch die aus den oben genannten Wirtszellen isolierten DNA-Moleküle, da durch die nochmalige Transformation in die Wirtszellen die Resistenz gegenüber Trichothecen bestätigt wurde. Die Transformation in Pflanzen bzw. Pflanzenzellen wurde bereits oben beschrieben, wobei wiederum die unterschiedlichsten Pflanzen bzw. Pflanzenzellen transformiert werden können. Dadurch sollte es möglich sein, Pflanzen mit verbesserten Eigenschaften für die Landwirtschaft herzustellen (erhöhte Resistenz gegen Trichothecene, dadurch erhöhte Resistenz gegen Trichothecen-produzierende Pilze, und somit geringere Trichothecen-Rückstände im Erntegut).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Zellen, ausgenommen eine W255C-Mutation umfassende *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen Stamm CLP1, die mit einem mutierten DNA-Molekül wie oben beschrieben, transformiert wurden, mutiertes RPL3 exprimieren und eine Trichothecen-Toleranz aufweisen.

Ebenfalls betrifft die Erfindung Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, die mit einem mutierten DNA-Molekül wie oben beschrieben transformiert wurden, mutiertes RPL3 exprimieren und eine Trichothecen-Toleranz aufweisen.

Die Trichothecen-Toleranz dieser transformierten Zellen, Pflanzen bzw. -Pflanzenzellen kann dabei jeden möglichen Trichothecen-Typ betreffen, vorzugsweise jedoch Typ A und Typ B. Auch das

Ausmaß der Trichothecen-Toleranz ist unterschiedlich, je nach Mutation im DNA-Molekül.

Die vorliegende Erfindung wird nun an Hand von den Beispielen sowie den in den Figuren dargestellten Ausführungsbeispielen, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, näher erläutert, wobei die

Fig. 1 die allgemeine Formel der Gruppe A-Trichothecene,

Fig. 2 die allgemeine Formel der Gruppe B-Trichothecene,

Fig. 3 die allgemeine Formel der Gruppe C-Trichothecene,

Fig. 4 die allgemeine Gruppe der Typ D-Trichothecene,

Fig. 5 das Plasmid pZGA121, und

Fig. 6 eine Liste von Teilsequenzen von RPL3-Genen verschiedener Organismen, wobei die Stelle umfassend das W255 und H256 gezeigt ist,

darstellen. Dabei sind in Tabelle 1 die Seitengruppen der Trichothecene gezeigt.

T a b e l l e 1

Seit ngruppen der Trichothecene in Fig. 1-4

Trivialname	R1	R2	R3	R4	R5
Gruppe A					
Trichothecene	H	H	H	H	H
Trichodermol	H	OH	H	H	H
Verrucarol	H	OH	OH	H	H
Scirpentriol	OH	OH	OH	H	H
T-2 tetraol	OH	OH	OH	H	OH
Trichodermin	H	OAc	H	H	H
Diacetoxyscirpenol	OH	OAc	OAc	H	H
HT-2 toxin	OH	OH	OAc	H	OiVal
T-2 toxin	OH	OAc	OAc	H	OiVal
Gruppe B					
Trichothecolone	H	OH	H	H	=O
Deoxynivalenol (DON)	OH	H	OH	OH	=O
3-ADON	OAc	H	OH	OH	=O
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	=O
Fusarenon-X	OH	OAc	OH	OH	=O
Trichothecin	H	OBc	H	H	=O
$\begin{array}{l} \text{OAc}=\text{OCOCH}_3 \quad \text{OiVal}=\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \text{OBc}=\text{OCOCH}=\text{CHCH}_3(\text{z}) \end{array}$					

B e i s p i e l 1 : Mutation von RPL3-Genen mittels E. coli-Stamm XLI-Red

Das Plasmid pZGA121 (siehe Fig. 5), dass als E. coli-Hefe-Shuttlevektor verwendet wird und eine RPL3-Mutation komplementieren kann, umfasst eine EcoRI-Schnittstelle, in die das Wildtyp-Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) RPL3-Gen cloniert wurde. In Fig. 6 sind Teilsequenzen von RPL3-Proteinen aus verschiedenen Organismen gezeigt, wobei deutlich ist, dass die Sequenz konserviert ist. Das Gen steht im Plasmid unter Wirkung des eigenen Promotors und kann die Funktion einer RPL3-disruptierten Hefe komplementieren. Das Plasmid pZGA121 enthält zusätzlich ein Hefegen (ADE2), das als Indikator der Effizienz der Mutagenese dient: wird ein intaktes ADE2-Gen in einen ade2-Hefestamm eingebracht, ist die resultierende Kolonie weiß, ist das mitmutierte ADE2*-

Gen jedoch defekt, zeigt die Kolonie so wie die *ade2*-Mutante Rotfärbung aufgrund der Akkumulation einer pigmentierten Vorstufe aus der Adeninbiosynthese. Weiters ist das Plasmid pZGA121 in Hefe konditional instabil (auf Galaktosemedium), da ein *GAL1*-Promotor neben dem Centromer plaziert ist und dessen Funktion stört. Als Selektionsmarker für die Hefetransformation dient das *TRP1*-Gen. Zusätzlich enthält das Plasmid als Antibiotika-Resistenz das Gen für die β -Lactamase, um in *E. coli*-Transformanten auf Antibiotika-versetzten Nährbäden kultiviert werden zu können.

Das Plasmid wurde in den *E. coli*-Stamm XLI-Red transformiert. Dieser *E. coli*-Stamm besitzt eine Spontan-Mutationsfrequenz, die um ca. das 5000fache erhöht ist als beim Wildtyp-Stamm. Die DNA, die in diesen Stamm transformiert und amplifiziert wird, wird fortlaufend fehlerhaft reproduziert und erhält dadurch Mutationen in ihrer Sequenz, mit einer Mutationswahrscheinlichkeit, die für alle Basen etwa gleich ist.

Transformation des *E. coli*-Mutationsstammes:

- 1) Transformation des *E. coli*-Mutationsstammes XLI-Red (siehe 3.13) mit dem Plasmid pZGA121 wie in 3.2.2. beschrieben (CaCl_2 -kompetent).
 - 400 μl XLI-Red werden mit 2 μg DNA gemischt und 30 Minuten auf Eis gesetzt.
 - 90 Sekunden bei 42°C im Wasserbad inkubieren.
 - 900 μl SOC (LB)-Medium zufügen und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.
 - Jeweils 200 μl der Transformationslösung auf eine LB-Amp100-Platte ausplattieren und über Nacht bei 37°C inkubieren.
- 2) Platten mit LB-Amp100 waschen (ca. 3 ml) und in einen Erlenmeyerkolben mit LB-Amp100 überführen. Über Nacht bei 37°C am Schüttler bebrüten.
- 3) Am nächsten Tag 50 μl der Bakteriensuspension in frisches LB-Amp100 (50 ml) überführen und wieder über Nacht bei 37°C am Schüttler inkubieren. Gleichzeitig werden von der Suspension Aliquots (2 x 2 ml) entnommen und zum Miniprepen eingefroren (-20°C).

- 20 -

- 4) Punkt 3) wird 7 mal wiederholt und man erhält 8 Plasmid-pools.
- 5) Von jedem Pool werden die Plasmide gewonnen (3.1.1.) und in kompetente (CaCl_2) Bakterien (*E. coli*) transformiert, um alle Klone in mutationsstabilen Bakterien zu erhalten: Die Durchführung der Transformation erfolgte wie in 1).
- 6) Die Platten der Retransformation werden mit 4 ml LB-Amp100 abgewaschen und in 50 ml LB-Amp100 über Nacht bei 37°C inkubiert.
- 7) Von der Suspension jeweils 1 ml bei -70°C und -20°C einfrieren und von der restlichen Suspension eine DNA-Präparation machen:
 - Suspension in einem 50 ml-Flacon abzentrifugieren (5 min; 5000 rpm).
 - In 4 ml Lösung I (50 mM Glucose; 2 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA (pH 8,0) resuspendieren (10 min schütteln).
 - Mit 8 ml Lösung II (0,2 N NaOH; 1 % SDS) durch Invertieren mischen (nicht vortexen) und bei Raumtemperatur nicht länger als 5 min inkubieren.
 - 6 ml eisgekühlte Lösung III (60 ml 5 M Kaliumacetat+11,5 ml Eisessig+28,5 ml H_2O ; die resultierende Lösung ist 3 M an K^+ -Ionen und 5 M an Acetat-Ionen) zusetzen, mischen und mindestens 20 Minuten auf -20°C setzen.
 - 15 Minuten 10000 rpm abzentrifugieren und den Überstand über Glaswolle abfiltrieren.
 - Mit 0,7fachem Volumen an Isopropanol fällen und 20 min abzentrifugieren (10000 rpm).
 - Pellet in 70 % Ethanol waschen und abzentrifugieren.
 - Pellet in 0,5 ml Wasser oder TE lösen.
- 8) Zum Quantifizieren der Ausbeute wird ein Aliquot mit RNase verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen (nicht gezeigt).

B e i s p i e l 2 : Mutation des RPL3-Gens mittels Hydroxylamin

- 1) 10 μg DNA (pZGA121) werden mit 500 μl Hydroxylamin-Reaktionslösung gemischt und bei 75°C inkubiert.
- 2) Von der Inkubationsmischung werden alle 20 Minuten jeweils 100 μl -Aliquots entnommen (5 DNA-Pools).

- 21 -

- 3) Die 100 µl-Aliquots werden mit 70 µl Isopropanol (oder 200 µl Ethanol 98 %) gefällt, abzentrifugiert und in 50 µl Wasser gelöst.
- 4) Von den Proben werden jeweils 3 µl entnommen und für die Elektroporation eingesetzt.
- 5) Die gesamten Ansätze auf LBamp100-Platten ausplattieren und über Nacht bei 37°C inkubieren.
- 6) Von jedem DNA-Pool des Hydroxylamin-Ansatzes die Platten mit LBamp100 abwaschen, vereinigen und in einem Erlenmeyerkolben 2 Stunden bei 37°C inkubieren.
- 7) Bei 5000 g 7 min abzentrifugieren.
- 8) Midiprep der Proben;
- 9) Nach dem Abfiltrieren über Glaswolle, Fällen mit Isopropanol und Waschen mit 70 % Ethanol sind die Proben für die Hefetransformation bereit.

Herstellung der Hydroxylamin-Reaktionslösung:

- 0,5 M Pyrophosphatpuffer (pH 7,99):
13,295 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ einwiegen und auf 100 ml mit H_2O auffüllen.
11,095 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ einwiegen und auf 100 ml mit H_2O auffüllen.
Beide Lösungen mit solchen Verhältnissen vereinigen, dass der resultierende pH-Wert = 7,00 ist.
- 5 M Hydroxylaminlösung:
3,5 g Hydroxylamin mit 7 ml H_2O mischen (pH ca. 2,1) und auf einen pH von 7,00 mit 10 N NaOH bringen. Mit H_2O auf 10 ml auffüllen.
- Mischen der Reaktionslösung:

Chemikalie	Stammlösung	Endkonzentration	Menge der Stammlösung
NaCl	5 M	100 mM	200 µ
EDTA	0,5 M	2 mM	40 µ
Pyrophosphat	0,25 M	50 mM	2 ml
Hydroxylamin	5 M	1 M	2 ml

Mit H_2O auf 10 ml auffüllen und das Gemisch zu 1 ml in Eppis abfüllen und bei -20°C einfrieren.

B e i s p i e l 3 : Transformation von Hefe mit mutagenisierter Plasmid-DNA.

Die oben beschriebenen mutagenisierten Plasmid-DNA-Moleküle wurden für die Retransformation in den Hefestand YZGA315 verwendet. Dieser Hefestamm ist abgeleitet von YPH252 und hat folgende Eigenschaften:

YZGA315: MAT α ; *ura3 leu2 his3 trp1 ade2 lys2*
rpl3::LYS2; pdr5::hisG; pZGA196 [URA3-GAL1-RPL3]

Der transformierte Hefestamm YZGA315 weist neben einem *trp1*- und *ade2*-Marker folgende wesentliche Eigenschaften auf: das chromosomale Wildtyp-RPL3-Gen ist disruptiert (*rpl3::LYS2*). Da RPL3 ein essentielles Gen ist, enthält der Stamm eine weitere, modifizierte RPL3-Kopie auf dem Plasmid pZGA196. Das RPL3-Gen auf diesem Plasmid ist unter Kontrolle eines GAL1-Promotors. Auf Glucosemedium ist dieser Promotor inaktiv und folglich kann der Stamm YZGA315 nicht auf Medien mit Glucose als C-Quelle wachsen, sondern nur auf Galaktosemedien. Weiters enthält der Stamm ein inaktiviertes PDR5-Gen (*pdr5::hisG*), wodurch dieser hypersensitiv auf Trichothecene ist (PDR5 codiert für ein ABC-Transporter-Protein, das in der Plasmamembran lokalisiert ist und unter ATP-Aufwand in die Zelle eingedrungenes Toxin wieder entfernt).

Werden Hefen mit Lithium-haltiger Lösung gewaschen und mit Polyethylen gemischt, sind diese in der Lage, Fremd-DNA aufzunehmen.

Die DNA-Transformation wird durch Anwesenheit von einzelsträngiger Carrier-DNA (Heringsperma-DNA) begünstigt.

- 1) Der zu transformierende Hefestamm wird, ausgehend von einer Einzelkolonie, in einem geeigneten Medium (50 ml) bei 30°C über Nacht herangezogen. Abhängig vom Wachstum der Hefen muss die Bebrütungsdauer auf 48 Stunden oder mehr ausgedehnt werden.
- 2) Die Ernte erfolgt bei einer OD₆₀₀=1. Dann wird die Suspension 5 min, 4000 g (Sorvall GSA: 5000 rpm) abzentrifugiert (50 ml Falcon) und der Überstand verworfen.

- 23 -

- 3) Die Zellen werden in 1-2 ml Lösung A resuspendiert und 30 min am Schüttler inkubiert.
- 4) Die Suspension in ein 2,2 ml Eppendorf überführen, abzentrifugieren und Überstand verwerfen. Das Pellet in geeigneter Menge Lösung A resuspendieren.
- 5) Für jede Transformation werden $\leq 5 \mu\text{g}$ zu transformierende DNA, 50 μg Carrier-DNA, 100 μl Hefesuspension, sowie 700 μl Lösung B gemischt und 30 min bei 30°C inkubiert.
- 6) Hitzeschock: 15 min bei 42°C.
- 7) Die Hefesuspension wird 5 s zentrifugiert und in 200 μl 1 x TE-Puffer (pH 7,5) resuspendiert.
- 8) Die Suspension auf geeignetem Selektionsmedium (z.B. SC-Trp-Platten) ausplattieren und bei 30°C bebrüten.
- 9) Hefekolonien auf demselben Nährmedium auf Einzelkolonien ausstreichen und bei 30°C bebrüten.

Material und Geräte:

Lösung A: 100 mM Li-Acetat

10 mM TrisCl (pH 7,5)

1 mM EDTA

Lösung B: 40 % PEG (Polyethylenglykol) 4000 (Cat.No. 81240, Fluka)

100 mM Li-Acetat

10 mM TrisCl (pH 7,5)

1 mM EDTA

Carrier-DNA: Heringsperma-DNA 10 mg/ml (Cat.No. 31162, FLUKA)
(denaturiert durch Hitzebehandlung)

SC-Trp/ $\frac{1}{4}$ Ade-Platten (vereinfacht): 1,43 g/l YNB (Yeast Nitrogen Base, Cat.No. 25685-033, GIBCO) 5,00 g/l NH_4SO_4 , 10 ml/l Stammlösung (100 x konzentriert) der Komponenten (Aminosäuren): Thr, Leu, His, Ile, Arg, Lys, Adenin, Uracil, kein Trp; mit einer Endkonzentration von 20 mg/l, außer Leu (60 mg/l). 2 % Agar und 2 % Glucose getrennt von den anderen Bestandteilen autoklavieren und vor dem Ausgießen gründlich mischen.

Transformanten, die auf SC-TRP-Medium (mit Glucose als C-Quelle) wachsen können und die folglich ein Plasmid mit einem funktionellen RPL3-Gen aufgenommen haben, werden selektiert. Die Trans-

- 24 -

formanten werden anschließend auf Trichothecen-hältiges Medium übergeführt und toxinresistente Mutanten selektiert.

Von den Platten wurden mit flüssigem YPD (4 ml) die Hefetransformanten abgewaschen und sorgfältig die Pools gemischt. Von dieser Mischung wurden jeweils ca. 50 µl auf YPD-Platten mit 200 ppm DON(Deoxynivalenol) aufgetragen und bei 30°C bebrütet.

Die hochkommenden Kolonien wurden wiederum auf YPD (+DON200ppm)-Platten auf Einzelkolonien ausgestrichen.

Insgesamt konnten auf diese Weise aus insgesamt ca. 280 000 gescreenten Hefetransformanten 50 neue DON-resistente Hefestämme gewonnen werden (YARM1 bis YARM50).

Zum Beweis, dass die für die Resistenz verantwortliche Mutation auf dem Plasmid lokalisiert ist, kann das Plasmid entweder wieder verloren werden (instabil auf Galaktose-Medium), oder zuerst aus der Hefe in E.coli übergeführt werden und der Test durch Retransformation des Hefestammes YZGA315 geführt werden. Durch Subklonierung und DNA-Sequenzierung kann die für die Resistenz verantwortliche Mutation identifiziert werden.

Das Resistenzverhalten der Hefe wurde durch Isolierung der Plasmide aus den selektierten Hefetransformanten, neuerliche Transformation in frische Hefezellen und Selektion auf YPD(+DON200ppm)-Platten bestätigt.

YPD: 1 % Yeast-Extrakt (Cat.No. 70161, FLUKA)
2 % Pepton (aus Fleisch; 1.07224 MERCK)
2 % Dextrose (Glucose; Cat.No. 49159, FLUKA)

B e i s p i e l 4 : Sequenzieren der Toxin-resistenten Klone

Prinzip:

Die Plasmide wurden mit dem Nukleospin-Reinigungskit aus den resistenten Hefekolonien gewonnen und gereinigt. Sequenziert wurde nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode mit dem System ABI310 von Perkin Elmer.

Bei diesem System sind die für den Kettenabbruch verantwortlichen Dideoxy-NTP's fluoreszenzmarkiert und können dadurch voneinander unterschieden werden.

Die Reaktion wird in einem Ansatz durchgeführt.

Die Proben werden im Gerät auf einer Trennsäule getrennt und jedes Fragment einzeln registriert.

Der Vorteil dieses Systems ist es, daß nur ein Ansatz pro Sequenzierung notwendig ist.

Durchführung:

- 1) PCR-Programm: [(96°C/30sec-50°C/15sec-60°C/4min)x25] hotlid on/kein Öl
- 2) Ansatz (20 µl): 4,0 µl TRR-Mix
2,0 µl DNA (30-500 ng je nach Herkunft:
PCR, Plasmid)
3,2 µl Primer (1 pmol/µl)
10,8 µl H₂O
- 3) Der Ansatz wird mit 50 µl 95 % Ethanol und 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) in einem 1,5 ml Eppendorf gefällt und für mindestens 10 Minuten auf Eis (-20°C) gestellt. Der Ansatz kann auch über Nacht oder länger auf -20°C gefällt werden, um eventuelle höhere Ausbeuten an DNA zu erhalten.
- 4) Die Fällung 20-30 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (14000 Umdrehungen/Minute) abzentrifugieren und Überstand vorsichtig verwerfen.
- 5) Das Pellet in ca. 100-200 µl 70 % Ethanol waschen und 15 Minuten abzentrifugieren (14 000 U/min).
- 6) Überstand vollständig abheben, 3-5 Minuten gut trocknen lassen und in 20 µl Template Supression Reagent (TSR) oder Formamid lösen.
- 7) 5 Minuten bei 96°C am Heizblock denaturieren und sofort auf Eis stellen (DNA quenchen).
- 8) Die Proben wurden am ABI310-SEQUENCE ANALYSER sequenziert.
- 9) Auswertung der Sequenzen mit den Programmen EDITSEQ und SEQMAN von DNASTAR (DNASTAR Inc.) und SEQUENCE ANALYSIS.

Material und Geräte:

DNA Sequenzierung Kit No. 403044 (enthält TRR-Mix); PERKIN ELMER
 3 M Natriumacetat (pH 4,6)
 95 % oder 98 % Ethanol
 70 % Ethanol
 Template Supression Reagent (TSR) No. 402844 (POP 6) PERKIN
 ELMER
 Formamid
 SEQUENCE ANALYSER ABI310; PERKIN ELMER
 Thermocycler OMN-E (HYBAID)

Die Plasmide wurden mit dem Nukleospin-Reinigungskit gewonnen und gereinigt. Zum Sequenzieren des RPL3-Gens der Plasmide standen die in Tabelle 2 angeführten, schon vorhandenen Primer zur Verfügung.

T a b e l l e 2

Pri- mer	Primer-Sequenz	Seq. ID.Nr.
TCM-A	5'-AAT GAA TTC AGT GGT AAT GCA ACA GCA AG-3'	2
TCM-B	5'-GAC TTC GTC AGA CAA ATG TTC AG-3'	3
TCM-C	5'-TGC CAA GAA AGA CTC ACA GAG G-3'	4
TCM-D	5'-AAG AAT TCT GTT GTA TGT AGC TAA CAA TAC TA-3'	5
TCM-E	5'-ACC AAG CTT CAA TCA TGT CTC ACA GAA AGT ACG A-3'	6
TCM-F	5'-GCA CCA ATA CAA GCA ACC-3'	7
TCM-G	5'-CAC TCC ACC AGT TGT CGT-3'	8
TCM-H	5'-CTG GTA GCA CCG TTA GC-3'	9
TCM-I	5'-CAA CGG TGA CAG CTT CGA-3'	10

Die fünf Plasmide wurden vollständig sequenziert, dabei wurden folgende Mutationen gefunden (Tabelle 3):

- 27 -

T a b e l l e 3
Mutationen der Plasmide

Plasmid-Mutante	Nucleotid-Austausch	Triplett-Veränderung	Aminosäure-Austausch
pARM8A	T4C	TCT → CCT	S2P
pARM34A	C26T	CCA → CTA	P9L
pARM14B	C766T	CAT → TAT	H256Y
pARM49B	T763C	TGG → CGG	W255R
pARM561	G765C	TGG → TGC	W255C

Beispiel 5 : Herstellung von Doppelmutanten

Um zu untersuchen, ob eine Resistenzsteigerung mit zwei Mutationen im RPL3-Gen möglich ist, wurden Doppelmutanten kloniert, die jeweils eine N-Mutation und eine C-Mutation enthielten (Tabelle 4).

T a b e l l e 4

Plasmid	Austausch	Mutation
pARM8A14B	T4C/C766T	S2P/H256Y
pARM34A14B	C26T/C766T	P9L/H256Y
pARM8A49B	T4C/T763C	S2P/W255R
pARM34A49B	C26T/T763C	P9L/W255R
pARM8A561	T4C/G765C	S2P/W255C
pARM34A561	C26T/G765C	P9L/W255C

Die Plasmide mit Doppel-Mutation wurden in den Hefestamm YZGA315 transformiert und vereinzelt. Die isolierten Hefemutanten (jeweils 3 µl einer Hefesuspension ($OD_{600}=0,01$)) wurden nun auf YPD-Platten verschiedener TTC (Trichothecin)-Konzentrationsstufen ausplattiert und deren Resistenzverhalten nach fünf Tagen beobachtet. Als Vergleichskontrolle wurden die Hefen auf eine YPD-Platte mit 200 ppm DON aufgetragen. Als Nullkontrolle wurde eine YPD-Platte (0,4 % Aceton, 0,4 % Ethanol) verwendet. Diese Menge an Ethanol und Aceton entsprach jener Menge der beiden Komponenten, die in der höchsten Konzentrationsstufe (10 ppm) als Lösungsmittel für das Toxin enthalten war.

Die Doppelmutanten schienen generell schlechter zu wachsen als die Einfachmutanten. Jedoch waren die Doppelmutanten pARM8A49B, pARM34A49B und pARM34A14B alle um eine Konzentrationsstufe (Wachstum bis 0,9 ppm bis 1 ppm) resistenter als die Einzelmutanten. Die Resistenz der Doppelmutante pARM8A49B reichte bis in den 2 ppm-Bereich im Gegensatz zur Einfachmutante pARM49, die bei 2 ppm TTC nicht mehr wachsen kann.

Damit konnte gezeigt werden, dass, obwohl die Doppelmutante scheinbar ein schlechteres Wachstum besitzt, diese resistenter gegenüber Trichothecen sind, als die Einzelmutanten.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Adam Dr, Gerhard
Innovationsagentur

<120> RPL3

<130> R35564

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 387

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 1

Met Ser His Arg Lys Tyr Glu Ala Pro Arg His Gly His Leu Gly Phe
1 5 10 15

Leu Pro Arg Lys Arg Ala Ala Ser Ile Arg Ala Arg Val Lys Ala Phe
20 25 30

Pro Lys Asp Asp Arg Ser Lys Pro Val Ala Leu Thr Ser Phe Leu Gly
35 40 45

Tyr Lys Ala Gly Met Thr Thr Ile Val Arg Asp Leu Asp Arg Pro Gly
50 55 60

Ser Lys Phe His Lys Arg Glu Val Val Glu Ala Val Thr Val Val Asp
65 70 75 80

Thr Pro Pro Val Val Val Val Gly Val Val Gly Tyr Val Glu Thr Pro
85 90 95

Arg Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Val Trp Ala Glu His Leu Ser Asp
100 105 110

Glu Val Lys Arg Arg Phe Tyr Lys Asn Trp Tyr Lys Ser Lys Lys Lys
115 120 125

Ala Phe Thr Lys Tyr Ser Ala Lys Tyr Ala Gln Asp Gly Ala Gly Ile
130 135 140

- 30 -

Glu Arg Glu Leu Ala Arg Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Val Val Arg Val
 145 150 155 160

Leu Val His Thr Gln Ile Arg Lys Thr Pro Leu Ala Gln Lys Lys Ala
 165 170 175

His Leu Ala Glu Ile Gln Leu Asn Gly Gly Ser Ile Ser Glu Lys Val
 180 185 190

Asp Trp Ala Arg Glu His Phe Glu Lys Thr Val Ala Val Asp Ser Val
 195 200 205

Phe Glu Gln Asn Glu Met Ile Asp Ala Ile Ala Val Thr Lys Gly His
 210 215 220

Gly Phe Glu Gly Val Thr His Arg Trp Gly Thr Lys Lys Leu Pro Arg
 225 230 235 240

Lys Thr His Arg Gly Leu Arg Lys Val Ala Cys Ile Gly Ala Trp His
 245 250 255

Pro Ala His Val Met Trp Ser Val Ala Arg Ala Gly Gln Arg Gly Tyr
 260 265 270

His Ser Arg Thr Ser Ile Asn His Lys Ile Tyr Arg Val Gly Lys Gly
 275 280 285

Asp Asp Glu Ala Asn Gly Ala Thr Ser Phe Asp Arg Thr Lys Lys Thr
 290 295 300

Ile Thr Pro Met Gly Gly Phe Val His Tyr Gly Glu Ile Lys Asn Asp
 305 310 315 320

Phe Ile Met Val Lys Gly Cys Ile Pro Gly Asn Arg Lys Arg Ile Val
 325 330 335

Thr Leu Arg Lys Ser Leu Tyr Thr Asn Thr Ser Arg Lys Ala Leu Glu
 340 345 350

Glu Val Ser Leu Lys Trp Ile Asp Thr Ala Ser Lys Phe Gly Lys Gly
 355 360 365

Arg Phe Gln Thr Pro Ala Glu Lys His Ala Phe Met Gly Thr Leu Lys
 370 375 380

Lys Asp Leu
 385

- 31 -

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 2

aatgaattca gtggtaatgc aacagcaag

29

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 3

gacttcgtca gacaaatggt cag

23

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 4

tgccaagaaa gactcacaga gg

22

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 5

aagaattctg ttgtatgtag ctaacaatac ta

32

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 6

accaagcttc aatcatgtct cacagaaagt acga

34

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 7

gcaccaatac aagcaacc

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 8

cactccacca gttgtcgt

18

<210> 9

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 9

ctggtagcac cgtttagc

17

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 10

caacggtgac agcttcga

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Ribosomales Protein L3 (RPL3), dadurch gekennzeichnet, dass dessen Aminosäuresequenz an der Stelle Serin 2 eine Mutation aufweist, so dass der Organismus, in dem das mutierte RPL3 exprimiert wird, eine erhöhte Trichothecen-Resistenz aufweist.
2. RPL3 nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass dessen Aminosäuresequenz an der Stelle Serin 2 eine Aminosäure mit einer aliphatischen Seitenkette aufweist.
3. RPL3 nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass dessen Aminosäuresequenz an Stelle des Serins ein Prolin aufweist.
4. RPL3, dadurch gekennzeichnet, dass dessen Aminosäuresequenz an der Stelle Prolin 9 eine Mutation aufweist, so dass der Organismus, in dem das mutierte RPL3 exprimiert wird, eine erhöhte Trichothecen-Resistenz aufweist.
5. RPL3 nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass dessen Aminosäuresequenz an Stelle des Prolins eine andere Aminosäure mit einer aliphatischen Seitenkette aufweist.
6. RPL3 nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass dessen Aminosäuresequenz an Stelle des Prolins ein Leucin aufweist.
7. RPL3, dadurch gekennzeichnet, dass dessen Aminosäuresequenz an der Stelle des Histidins 256 eine Mutation aufweist, so dass der Organismus, in dem das mutierte RPL3 exprimiert wird, eine erhöhte Trichothecen-Resistenz aufweist.
8. RPL3 nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass dessen Aminosäuresequenz an Stelle des Histidins eine Aminosäure mit einer aromatischen Seitenkette aufweist.
9. RPL3 nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass dessen Aminosäuresequenz an Stelle des Histidins ein Tyrosin aufweist.

- 35 -

10. RPL3, dadurch gekennzeichnet, dass dessen Aminosäuresequenz zumindest an zwei Stellen eine Mutation gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 aufweist.

11. RPL3 nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass dessen Aminosäuresequenz eine Mutation im C-terminalen Bereich und eine im N-terminalen Bereich aufweist.

12. RPL3 nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass am C-Terminus der Aminosäuresequenz eine zusätzliche Sequenz angehängt ist.

13. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es für ein RPL3 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 kodiert.

14. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Teilsequenz des DNA-Moleküls gemäß Anspruch 13 umfasst, wobei es für eine Aminosäuresequenz kodiert, die zumindest den Bereich einer Mutation eines RPL3-Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 12 umfasst.

15. DNA-Molekül nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass es kovalent mit einer nachweisbaren Markierungssubstanz assoziiert ist.

16. Biologisch funktioneller Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15 umfasst.

17. Verfahren zur Herstellung von Trichothecen-toleranten rekombinanten Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15 oder ein Vektor gemäß Anspruch 16 in die Zelle eingeschleust und das mutierte RPL3 exprimiert wird.

18. Verfahren zur Herstellung von Trichothecen-toleranten rekombinanten Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15 oder ein Vektor gemäß Anspruch 16 in die Pflanze bzw. Pflanzenzellen eingeschleust und das mutierte RPL3 exprimiert

wird.

19. Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass sie im Genom ein DNA-Molekül bzw. eine Mutation gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15 umfassen, so dass sie ein mutiertes RPL3 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 exprimieren und dadurch eine Trichothecen-Toleranz aufweisen.

20. Zellen nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Typ B-Trichothecen-Toleranz aufweisen.

21. Zellen nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Deoxynivalenol (DON)-Toleranz aufweisen.

22. Zellen nach einem der Ansprüche 19 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Trichothecen-Resistenz von über 50 %, vorzugsweise über 200 %, verglichen mit dem jeweiligen Wildtyp aufweisen.

23. Pflanze bzw. Pflanzenzellen, dadurch gekennzeichnet, dass sie im Genom ein DNA-Molekül bzw. eine Mutation gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15 umfasst bzw. umfassen, so dass sie ein mutiertes RPL3 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 exprimiert bzw. exprimieren und eine Trichothecen-Toleranz aufweist bzw. aufweisen.

24. Pflanze bzw. Pflanzenzellen nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Typ B-Trichothecen-Toleranz aufweist bzw. aufweisen.

25. Pflanze bzw. Pflanzenzellen nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Deoxynivalenol (DON)-Toleranz aufweist bzw. aufweisen.

26. Pflanze bzw. Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Trichothecen-Resistenz von über 50 %, vorzugsweise über 200 %, verglichen mit dem jeweiligen Wildtyp aufweist bzw. aufweisen.

27. Verfahren zur Herstellung eines DNA-Moleküls umfassend eine für RPL3 codierende Region, das in dem Organismus, in dem es exprimiert wird, zu einer erhöhten Trichothecen-Resistenz führt, dadurch gekennzeichnet, dass ein Wildtyp-RPL3-Gen, ausgenommen an der Stelle Tryptophan 255, punktmutiert wird, wonach das mutierte Gen in einen Testorganismus eingeschleust wird, der daraufhin mutiertes RPL3 exprimiert, wobei der Testorganismus anschließend auf einem Nährmedium, umfassend Trichothecen, kultiviert und selektiert wird, wonach mutierte DNA-Moleküle aus den selektierten Klonen isoliert und gereinigt und gegebenenfalls sequenziert werden.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass der Testorganismus, in den das mutierte DNA-Molekül eingeschleust ist, eine Hypersensitivität gegenüber Trichothecene aufweist.

29. Verfahren nach Anspruch 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass der Testorganismus, in den das mutierte DNA-Molekül eingeschleust ist, eine Genunterbrechung im genomischen RPL3 aufweist.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass das mutierte DNA-Molekül zumindest einen Selektions-Marker umfasst.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Mutation mittels Hydroxylamin durchgeführt wird.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Mutation in einem E. coli-Mutationsstamm, z.B. XLI-Red, durchgeführt wird.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass das Nährmedium zur Selektion der transformierten Wirtsorganismen zumindest 100 ppm Deoxynivalenol (DON), vorzugsweise zumindest 200 ppm DON, umfasst.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass nach Isolierung und Reinigung der mutierten DNA-Moleküle diese in Wirtszellen eingeschleust werden, die auf Nährmedium umfassend Trichothecen kultiviert und selektiert werden, wonach mutierte DNA-Moleküle gegebenenfalls wiederum isoliert und gereinigt werden.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass das Wildtyp-RPL3-Gen an der Stelle Serin 2 punktmutiert wird.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass das Wildtyp-RPL3-Gen an der Stelle Prolin 9 punktmutiert wird.

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass das Wildtyp-RPL3-Gen an der Stelle Histidin 256 punktmutiert wird.

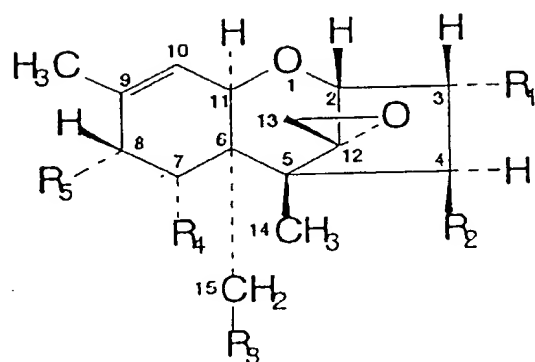
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 37, dadurch gekennzeichnet, dass nach Isolierung und Reinigung der mutierten DNA-Moleküle diese in Pflanzen bzw. Pflanzenzellen transformiert werden.

39. Zellen, ausgenommen eine W255C-Mutation umfassende *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen Stamm CLP1, dadurch gekennzeichnet, dass sie mit einem mutierten DNA-Molekül, das gemäß einem der Ansprüche 27 bis 37 hergestellt wurde, transformiert wurden, mutiertes RPL3 exprimieren und eine Trichothecen-Toleranz aufweisen.

40. Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, dadurch gekennzeichnet, dass sie mit einem mutierten DNA-Molekül, das gemäß einem der Ansprüche 27 bis 37 hergestellt wurde, transformiert wurden, mutiertes RPL3 exprimieren und eine Trichothecen-Toleranz aufweisen.

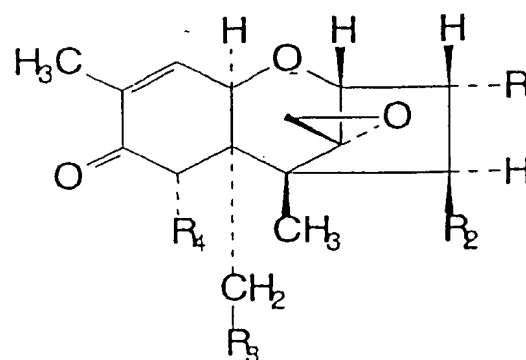
Strukturgruppen der Trichothecene

FIG. 1



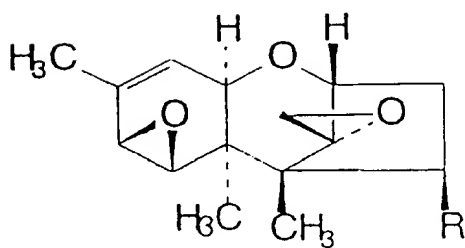
Gruppe A

FIG. 2



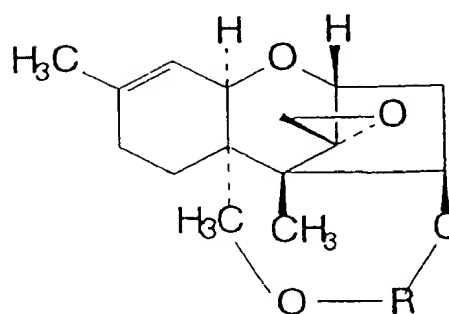
Gruppe B

FIG. 3



Gruppe C

FIG. 4



Gruppe D

Genotyp-Schema des Plasmids pZGA121

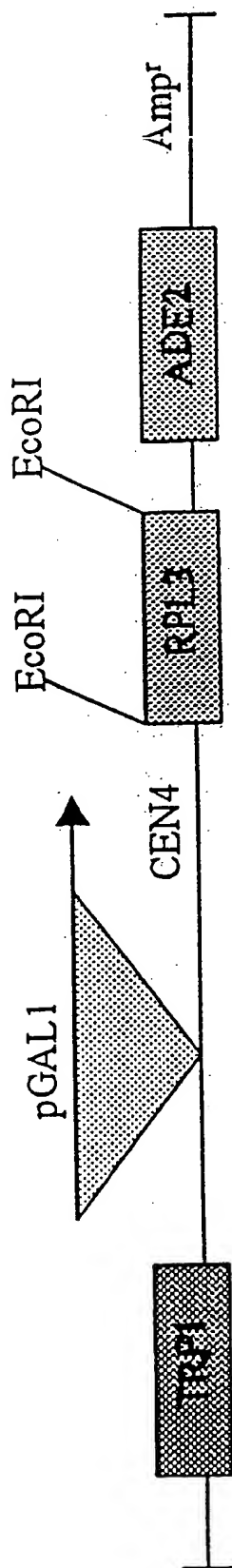


FIG. 5

3/3

Mus_musculus	:	WHTKKLPRKTHRGRLRKVACIGAWHPARVAFTVARAGQKGYHH RTE
Rattus_rattus	:	WHTKKLPRKTHRGRLRKVACIGAWHPARVAFS VARAGQKGYHH RTE
Homo_sapiens_A	:	WHTKKLPRKTHRGRLRKVACIGAWHPARVAFS VARAGQKGYHH RTE
Homo_sapiens_B	:	WHTKKLPRKTHRGRLRKVACIGAWHPARVAFS VARAGQKGYHH RTE
Bos_taurus	:	WHTKKLPRKTHRGRLRKVACIGAWHPARVAFS VARAGQKGYHH RTE
Sus_scofra	:	WHTKKLPRKTHRGRLRKVACIGAWHPARMAFS VARAGQKGYHH RTE
Caenorhabditis_elegans	:	WHTKKLPRKTHRGRLRKVACIGAWHPSRVAFTVARAGQKGFHH RTE
Toxocara_canis	:	WHTKKLPRKTHRGRLRKVACIGAWHPSRVQFTVARAGQKGYHH RTE
Drosophila_melanogaster	:	WHTKKLPRKTHRGRLRKVACIGAWHPSRVSTTVARAGQKGYHH RTE
Schizosaccharomyces_pombe_1	:	WGTRKLPKTHRGRLRKVACIGAWHPANVQWTVARAGNAGYMH RTQ
Schizosaccharomyces_pombe_2	:	WGTRKLPKTHRGRLRKVACIGAWHPANVQWTVARAGNAGYMH RTQ
Saccharomyces_cerevisiae	:	WGTRKLPKTHRGRLRKVACIGAWHPAHVMWSVARAGQKGYH SR TS
Trichoderma_harzianum	:	WGTRKLPKTHRGRLRKVACIGAWHPSHVQWTVARAGQKGYH SR TS
Ricinus_communis	:	WGVTRLPRKTHRGRLRKVACIGAWHTARVSFTVARAGQKGYH SR TS
Lycopersicon_esculentum	:	WGVTRLPRKTHRGRLRKVACIGAWHPARVSFTVARAGQKGYH SR TS
Oryza_sativa_A	:	WGVTRLPRKTHRGRLRKVACIGAWHPARVSYTVARAGQKGYH SR TS
Oryza_sativa_B	:	WGVTRLPRKTHRGRLRKVACIGAWHPARVSYTVARAGQKGYH SR TS
Arabidopsis_thaliana_A	:	WGVTRLPRKTHRGRLRKVACIGAWHPARVSYTVARAGQKGYH SR TS
Arabidopsis_thaliana_B	:	WGVTRLPRKTHRGRLRKVACIGAWHPARVSYTVARAGQKGYH SR TS
Dictyostelium_discoideum	:	WGVRLKLPKTHRGRLRKVACIGAWHPSRVSTTVPRAGQLGYH SR TS

FIG. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/AT 00/00194

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/31 A01H5/00 C12N1/19 C12N1/21 C07K14/395
C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01H C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EP0-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 09173 A (GLEDDIE STEPHEN C ; HARRIS LINDA J (CA); SIMMONDS JOHN A (CA); CANA) 25 February 1999 (1999-02-25) figures 2,5; examples 1-7 ---	27, 28, 30-34, 38-40
P, X	WO 00 39291 A (DINMAN JONATHAN D ; HUDAK KATALIN A (US); TUMER NILGUN E (US); UNIV) 6 July 2000 (2000-07-06) page 24 page 28 page 55, line 26 - line 27 --- -/--	27, 28, 30, 34, 40

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 October 2000

Date of mailing of the international search report

02/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/AT 00/00194

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PELTZ STUART W ET AL: "Ribosomal protein L3 mutants alter translational fidelity and promote rapid loss of the yeast killer virus." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 19, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 384-391, XP000952649 ISSN: 0270-7306 the whole document</p>	27,28, 30,34,40
A	<p>KIM ET AL: "RIBOSOMAL PROTEIN GENE EXPRESSION AND TRICHOHECENE RESISTANCE IN ARABIDOPSIS THALIANA" DISSABS, vol. 52, no. 2B, 1991, page 657 XP002083007</p>	
A	<p>SCHULTZ L D ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE TCML GENE (RIBOSOMAL PROTEIN L3) OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE" JOURNAL OF BACTERIOLOGY,US,WASHINGTON, DC, vol. 155, no. 1, 1 July 1983 (1983-07-01), pages 8-14, XP000617038 ISSN: 0021-9193</p>	
A	<p>SCHINDLER ET AL: "Trichodermin resistance-mutation affecting eukaryotic ribosomes" NATURE,GB,MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, vol. 248, 5 April 1974 (1974-04-05), pages 535-536, XP002083004 ISSN: 0028-0836</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/AT 00/00194

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9909173 A	25-02-1999	US 6060646 A AU 8526398 A CN 1268974 T EP 1003867 A	09-05-2000 08-03-1999 04-10-2000 31-05-2000
WO 0039291 A	06-07-2000	AU 2401800 A	31-07-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen
PCT/AT 00/00194

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/31 A01H5/00 C12N1/19 C12N1/21 C07K14/395 C12N15/82		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole) IPK 7 C12N A01H C07K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) BIOSIS, EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 09173 A (GLEDDIE STEPHEN C ;HARRIS LINDA J (CA); SIMMONDS JOHN A (CA); CANA) 25. Februar 1999 (1999-02-25) Abbildungen 2,5; Beispiele 1-7 ---	27,28, 30-34, 38-40
P,X	WO 00 39291 A (DINMAN JONATHAN D ;HUDAK KATALIN A (US); TUMER NILGUN E (US); UNIV) 6. Juli 2000 (2000-07-06) Seite 24 Seite 28 Seite 55, Zeile 26 - Zeile 27 --- -/--	27,28, 30,34,40
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 25. Oktober 2000		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 02/11/2000
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Bevollmächtigter Bediensteter Espen, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter nationale Aktenzeichen

PCT/AT 00/00194

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>PELTZ STUART W ET AL: "Ribosomal protein L3 mutants alter translational fidelity and promote rapid loss of the yeast killer virus."</p> <p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 19, Nr. 1, Januar 1999 (1999-01), Seiten 384-391, XP000952649 ISSN: 0270-7306 das ganze Dokument</p> <p>----</p>	27,28, 30,34,40
A	<p>KIM ET AL: "RIBOSOMAL PROTEIN GENE EXPRESSION AND TRICHOECENE RESISTANCE IN ARABIDOPSIS THALIANA"</p> <p>DISSABS, Bd. 52, Nr. 2B, 1991, Seite 657 XP002083007</p> <p>----</p>	
A	<p>SCHULTZ L D ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE TCML GENE (RIBOSOMAL PROTEIN L3) OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE"</p> <p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY,US,WASHINGTON, DC, Bd. 155, Nr. 1, 1. Juli 1983 (1983-07-01), Seiten 8-14, XP000617038 ISSN: 0021-9193</p> <p>----</p>	
A	<p>SCHINDLER ET AL: "Trichodermin resistance-mutation affecting eukaryotic ribosomes"</p> <p>NATURE,GB,MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, Bd. 248, 5. April 1974 (1974-04-05), Seiten 535-536, XP002083004 ISSN: 0028-0836</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 00/00194

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9909173	A	25-02-1999	US	6060646 A	09-05-2000
			AU	8526398 A	08-03-1999
			CN	1268974 T	04-10-2000
			EP	1003867 A	31-05-2000
WO 0039291	A	06-07-2000	AU	2401800 A	31-07-2000